

CELL SCREENING SUBSTRATE AND METHOD FOR PRODUCING THE SAME, CELL SCREENING METHOD AND CELL SCREENING DEVICE EACH USING THE SAME

Publication number: JP2002355025

Publication date: 2002-12-10

Inventor: NISHIGUCHI KENJI; MIYAZAKI TAKESHI; MATSUDA
RYOICHI; WATANABE KOHEI

Applicant: CANON KK

Classification:

- international: G01N33/48; C12M1/34; C12Q1/06; C12Q1/16;
G01N21/78; G01N33/48; C12M1/34; C12Q1/06;
C12Q1/16; G01N21/77; (IPC1-7): C12M1/34; C12Q1/06;
C12Q1/16; G01N21/78; G01N33/48

- european:

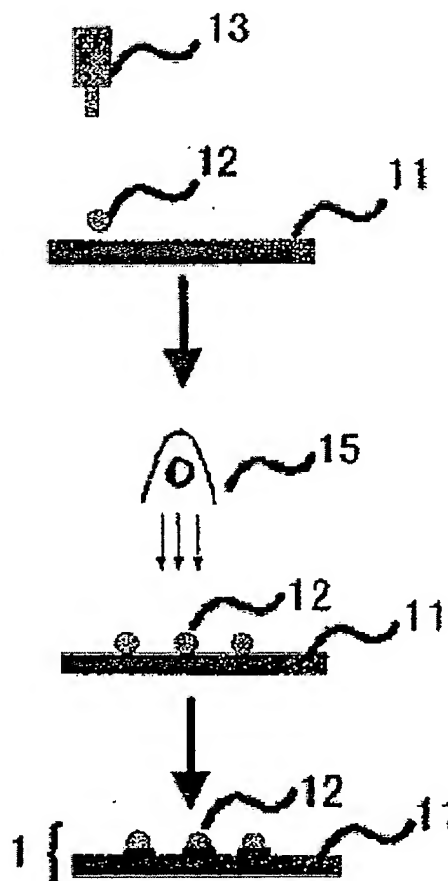
Application number: JP20020096840 20020329

Priority number(s): JP20020096840 20020329; JP20010097218 20010329

Report a data error here

Abstract of JP2002355025

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a cell screening substrate formable by a simple process. **SOLUTION:** This cell screening substrate characterized by having a plurality of areas differing in cell screening function from each other is formed by disposing a plurality of cell screening substances on the respective desired areas on a base by a microdroplet-issuing means to effect immobilizing the substances.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-355025

(P2002-355025A)

(43) 公開日 平成14年12月10日 (2002. 12. 10)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード [*] (参考)
C 1 2 M 1/34		C 1 2 M 1/34	B 2 G 0 4 5
C 1 2 Q 1/06		C 1 2 Q 1/06	2 G 0 5 4
1/16		1/16	4 B 0 2 9
G 0 1 N 21/78		G 0 1 N 21/78	C 4 B 0 6 3
33/48		33/48	M
審査請求 未請求 請求項の数20 O L (全 12 頁)			

(21) 出願番号 特願2002-96840 (P2002-96840)

(22) 出願日 平成14年3月29日 (2002. 3. 29)

(31) 優先権主張番号 特願2001-97218 (P2001-97218)

(32) 優先日 平成13年3月29日 (2001. 3. 29)

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000001007

キヤノン株式会社

東京都大田区下丸子3丁目30番2号

(72) 発明者 西口 憲治

東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤ

ノン株式会社内

(72) 発明者 宮崎 健

東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤ

ノン株式会社内

(72) 発明者 松田 良一

東京都世田谷区代沢2-37-5

(74) 代理人 100088328

弁理士 金田 暢之 (外2名)

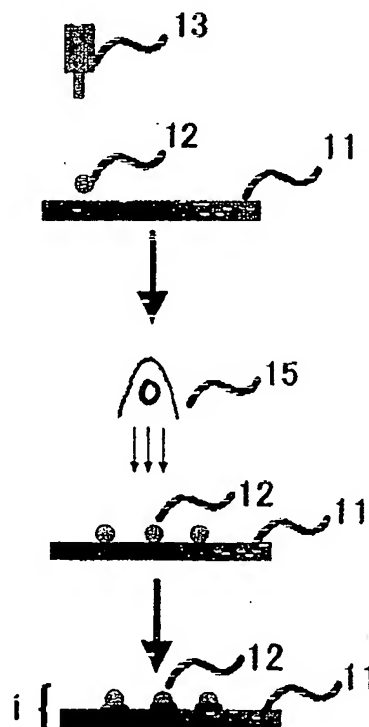
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞スクリーニング基板とその製造方法、それを用いた細胞スクリーニング法および細胞スクリーニング装置

(57) 【要約】

【課題】 簡便な工程で形成できる細胞スクリーニング基板を提供すること。

【解決手段】 複数の細胞スクリーニング物質を、微小液滴吐出手段でベース上の所望の領域に配置して固定化し、異なる細胞スクリーニング機能を有する複数の領域を有することを特徴とする細胞スクリーニング基板を形成する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 複数の細胞スクリーニング物質を、微小液滴吐出手段でベース上の所望の領域に配置して固定化し、異なる細胞スクリーニング機能を有する複数の領域を有することを特徴とする細胞スクリーニング基板。

【請求項2】 前記複数の領域に、固定化されている細胞スクリーニング物質の組合せが異なる複数の領域が含まれている請求項1に記載の細胞スクリーニング基板。

【請求項3】 前記複数の領域に、固定化されている細胞スクリーニング物質の密度が異なる複数の領域が含まれている請求項1または2に記載の細胞スクリーニング基板。

【請求項4】 各領域、あるいは、2つ以上の各領域から形成される領域群が凹部内に形成されている請求項1～3のいずれかに記載の細胞スクリーニング基板。

【請求項5】 各領域、あるいは、2つ以上の各領域から形成される領域群が凸状の壁状構造物により囲まれている請求項1～4のいずれかに記載の細胞スクリーニング基板。

【請求項6】 微小液滴吐出手段により各細胞スクリーニング物質をベース上の所望の領域に配置する工程と、該ベース上の各領域で細胞スクリーニング物質を固定化する工程を含むことを特徴とする細胞スクリーニング基板の製造方法。

【請求項7】 微小液滴吐出手段として、サーマルインクジェット法による吐出手段を用いる請求項6に記載の細胞スクリーニング基板の製造方法。

【請求項8】 微小液滴吐出手段として、ピエゾインクジェット法による吐出手段を用いる請求項6に記載の細胞スクリーニング基板の製造方法。

【請求項9】 該固定化工程に、外部から固定のためのエネルギーを加える工程をさらに含む請求項6～8のいずれかに記載の細胞スクリーニング基板の製造方法。

【請求項10】 請求項1～5のいずれかに記載の細胞スクリーニング基板を用いた細胞スクリーニング法であって、前記細胞スクリーニング基板の細胞スクリーニング物質の固定領域に接触する培養液中で細胞を培養する工程を有することを特徴とする細胞スクリーニング法。

【請求項11】 前記固定領域と接触する培養液中に前記細胞のスクリーニングに必要な物質を補充する工程を有する請求項10に記載の細胞スクリーニング法。

【請求項12】 前記固定領域が前記培養液の流れに接触している請求項10または11に記載の細胞スクリーニング法。

【請求項13】 前記細胞の形態変化を観察する工程を更に含む請求項10～12のいずれかに記載の細胞スクリーニング法。

【請求項14】 評価の際に細胞を染色する請求項13に記載の細胞スクリーニング法。

【請求項15】 前記細胞内で合成された物質の定量を

行う工程を含む請求項10～14のいずれかに記載の細胞スクリーニング法。

【請求項16】 前記細胞内に取り込まれた物質の定量を行う工程を含む請求項10～14のいずれかに記載の細胞スクリーニング法。

【請求項17】 放射線量測定、蛍光量測定、発光量測定および吸光度測定の少なくとも1種により前記物質の定量を行う工程を含む請求項15または16に記載の細胞スクリーニング法。

【請求項18】 請求項1～5のいずれかに記載の細胞スクリーニング基板を用いる細胞スクリーニング装置であって、前記細胞スクリーニング基板の細胞スクリーニング物質の固定領域に接触する培養液中で細胞を培養する手段を有することを特徴とする細胞スクリーニング装置。

【請求項19】 更に、前記培養手段による細胞の形態変化の評価手段、細胞内で合成された物質の定量手段および細胞内に取り込まれた物質の定量手段の少なくとも一手段を有している請求項18に記載の細胞スクリーニング装置。

【請求項20】 更に、前記細胞スクリーニング基板を製造する手段を有する請求項18または19に記載の細胞スクリーニング装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、細胞の接着、増殖、分化、生存、未分化状態の維持及び細胞死の少なくとも1つに寄与する物質を特定する為に用いることのできる細胞スクリーニング基板とその製造方法、それを用いた細胞のスクリーニング方法および細胞スクリーニング装置に関する。

【0002】

【従来の技術】近年、動植物の細胞を種々の条件下において培養する研究、あるいは特定の培養細胞による産生物の研究が活発に行われており、特に人工的には合成が不可能であるか、あるいは合成が極めて困難な物質を特定の細胞活動を利用して製造することが多方面において検討されている。

【0003】また、細胞の増殖・分化に影響を与える物質を特定し、目的に応じて所望の細胞を増殖、分化させようという研究が行われており、細胞工学や医工学の急速な進歩とともに、細胞を用いた超小型バイオセンサーや人工臓器、更にはニューロコンピューターなどが注目を集め、これらに応用すべく活発な研究活動がなされている。

【0004】しかしながら前述のように生体外で細胞を利用するには、細胞を望むように配列させ、その増殖、分化や物質産出を制御することが不可欠であるが、細胞を配列させ、その増殖、分化や物質産出を制御する機構が十分解明されておらず、この様な観点で細胞を制御し

ながら培養することは極めて困難で、前述のような細胞を利用した研究開発の進展の大きな障壁となっている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】細胞の配列を制御する試みとしては、USP5108926号公報のように、インクジェットプリンターを用いて細胞接着性蛋白質を塗布してパターンを形成し、この上で細胞を培養した例がある。この方法では、細胞接着性蛋白質が塗布されたパターン上で細胞を培養することはできるが、その増殖・分化や物質産出の制御を行い、細胞をスクリーニングすることはできない。

【0006】また、「蛋白質・核酸・酵素」、45～5、727～734(2000)では、細胞の増殖・分化に影響を与える細胞成長因子を基板上にフォトリソグラフィ技術を用いて固定化し、細胞の増殖・分化に与える影響の検討をしている。しかしながら、細胞成長因子を固定化した基板を細胞のスクリーニング手段として用いておらず、また、フォトリソグラフィ法では、生体内に少量しか存在しないこれら生体物質を浪費し、露光、現像といったプロセスを繰り返さなければならず製造工程が複雑となる。

【0007】また、特表2000-512009号公報では、細胞接着性に影響を与える物質を基板上に固定化し、細胞のスクリーニングを行う方法について提案がなされている。ここでは、基板上に設けられた反応性官能基と細胞接着性物質を二価の架橋試薬により固定化している。反応性官能基と細胞接着性物質を結合させる際にフォトリソグラフィを用いており、前述したことと同様の課題が生じるだけでなく、複数の細胞接着性物質を固定化する際には、すでに固定化されている物質と新たに固定化する物質が所望でない位置で二価の架橋試薬で結合されることを回避することは極めて困難で、所望の位置に、細胞接着性物質を配置することは極めて困難である。また、増殖や分化、更には、物質産出に影響する物質を固定化することはなく、細胞を各ウェルに接着性物質により固定化し、培養液により培養される過程で細胞が産生する物質を捉えることで細胞をスクリーニングするものであり、本発明のように細胞の接着性や増殖、分化、生存、未分化状態の維持、細胞死及び物質産出の少なくとも1つに影響する物質をスクリーニングするためのものではない。

【0008】本発明の目的は、上述の従来例の持つ課題を解消せしめ簡便な工程で形成できる細胞スクリーニング基板及びその製造方法を提供し、細胞工学等の研究をさらに発展させ、また細胞を利用した各種デバイスを作製するための基盤となる技術を提供することにある。

【0009】さらに、本発明の目的は、これら細胞スクリーニング基板上で培養された細胞を用いて、細胞の接着性や増殖、分化、生存、未分化状態の維持、細胞死及び物質産出の少なくとも1つに影響する物質のスクリー

ングを行う方法を提供するものである。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明の細胞スクリーニング基板は、複数の細胞スクリーニング物質を微小液滴吐出手段でベース上の所望の領域に配置して固定化し、異なる細胞スクリーニング機能を有する複数の領域を有することを特徴とするものである。

【0011】この細胞スクリーニング基板の複数の領域には、固定化されている細胞スクリーニング物質の組合せが異なる複数の領域が含まれていてもよい。また、前記複数の領域に、固定化されている細胞スクリーニング物質の密度が異なる複数の領域が含まれていてもよい。更に、各領域、あるいは、2つ以上の各領域から形成される領域群が凹部内に形成されていてもよい。また、各領域、あるいは、2つ以上の各領域から形成される領域群が凸状の壁状構造物により囲まれていてもよい。

【0012】一方、本発明の細胞スクリーニング基板の製造方法は、微小液滴吐出手段により各細胞スクリーニング物質をベース上の所望の領域に配置する工程と、該ベース上の各領域で細胞スクリーニング物質を固定化する工程を含むことを特徴とするものである。

【0013】この微小液滴吐出手段としては、サーマルインクジェット法による吐出手段や、ピエゾインクジェット法による吐出手段を用いることができる。また、この固定化工程に、外部から固定のためのエネルギーを加える工程をさらに含んでいてもよい。

【0014】本発明にかかる細胞スクリーニング法は、上記の構成の細胞スクリーニング基板を用いた細胞スクリーニング法であって、前記細胞スクリーニング基板の細胞スクリーニング物質の固定領域に接触する培養液中で細胞を培養する工程を有することを特徴とするものである。

【0015】上記細胞スクリーニング法は、固定領域と接触する培養液中に前記細胞のスクリーニングに必要な物質を補充する工程を有していてもよい。また、前記固定領域が前記培養液の流れに接触している、例えば培養液を灌流させて培養を行う態様を採るものであってもよい。

【0016】上記細胞スクリーニング方法は、更に、所望の領域での細胞の形態変化を観察する工程を含むものであってもよく、評価の際に細胞を染色する方法を用いることもできる。更に、上記細胞スクリーニング法は、前記基板上の所望の領域での細胞内で合成された物質の定量を行う工程を含むこともでき、また、前記基板上の所望の領域での細胞内に取り込まれた物質の定量を行う工程を含むこともできる。物質の定量には、放射線量測定、蛍光量測定、発光量測定及び吸光度測定の少なくとも1種を用いることができる。

【0017】すなわち、本発明にかかる細胞スクリーニング法におけるスクリーニングは、例えば、以下の項目

に基づいて行うことができる。

- 1) 基板上の所望の領域での細胞の形態変化を評価する。
- 2) 基板上の所望の領域での細胞内で合成された物質の定量を行う。
- 3) 基板上の所望の領域での細胞内に取り込まれた物質の定量を行う。
- 4) 放射線量測定により物質の定量を行う。
- 5) 蛍光量測定により物質の定量を行う。
- 6) 発光量測定により物質の定量を行う。
- 7) 吸光度測定により物質の定量を行う。

【0018】本発明にかかる細胞スクリーニング装置は、上記の構成の細胞スクリーニング基板を用いる細胞スクリーニング装置であって、前記細胞スクリーニング基板の細胞スクリーニング物質の固定領域に接触する培養液中で細胞を培養する手段を有することを特徴とするものである。

【0019】この装置は、更に、前記培養手段による細胞の形態変化の評価手段、細胞内で合成された物質の定量手段および細胞内に取り込まれた物質の定量手段の少なくとも一手段を有しているものであってもよい。また、更に、前記細胞スクリーニング基板を製造する手段を有するものであってもよい。

【0020】本発明にかかる細胞スクリーニング基板を用いたスクリーニングによれば、スクリーニングの結果、細胞の増殖・分化、生存および未分化状態の維持、細胞死または、物質産出に必要な因子を特定でき、細胞を効率的に培養するための方法を決定することが可能となる。また、固定化する物質を薬にすれば、培養された細胞がどのような薬の組合せや量の場合に最も効果があるかを評価できる。例えば、いわゆる環境ホルモンといわれる化学物質を封入したアクリルアミドゲルなどの徐放性のカプセルを固定化した基板を用いれば、環境ホルモンが該カプセルから徐々に培養液中に流出し、これら化学物質に対する人の感受性を評価することが可能となる。更にこれら評価結果に基づいて、種々の疾患に対する人それぞれの診断法を決定することが可能となる。

【0021】

【発明の実施の形態】以下に、本発明を詳細に説明する。

【0022】本発明の細胞スクリーニング基板の一例を説明する。図2に示すように、細胞スクリーニング基板1は、図1に示すベース（基体）11上に2種類以上（図2においては、4種類）の細胞スクリーニング物質12が所望の位置（121～124）に配置されており、各細胞スクリーニング物質12はベース11上に固定化されている。2種類以上の細胞スクリーニング物質12を固定化することにより、高度な細胞の接着、増殖、及び分化の少なくとも1つの制御が可能となる。

【0023】また、本発明において細胞スクリーニング

物質12は、細胞のベース11上への接着性や、細胞の増殖、分化、生存および未分化状態の維持、細胞死、または、物質産出に影響を与える培養制御用の物質のことをいい、これには、細胞外基質蛋白質や細胞の表面と特異的結合能を有する抗体、サイトカインの他、細胞と結合、あるいは、細胞内に取り込まれ、細胞の増殖、分化、生存および未分化状態の維持、細胞死、または、物質産出に影響を与える化学物質などが含まれる。

【0024】例えば、細胞外基質蛋白質としては、コラーゲンやエラスチン、フィブロネクチン、ラミニンなどが挙げられる。また、サイトカインの中には、細胞成長因子やホルモンと呼ばれるものが含まれ、細胞成長因子には、神経成長因子（NGF）、上皮細胞成長因子（EGF）、繊維芽細胞成長因子（FGF）などが挙げられる。また、ホルモンとしてはインスリンやアドレナリンなどが挙げられる。また、これ以外の化学物質として、アレルギーを引き起こすアレルゲンなどの物質や、いわゆる環境ホルモンと呼ばれる種々の化学物質が挙げられる。

【0025】固定化された細胞スクリーニング物質12は、ベース11上で固定化されている細胞スクリーニング物質12の種類や配置パターンといった化学的・物理的性質の違いにより領域を形成している。

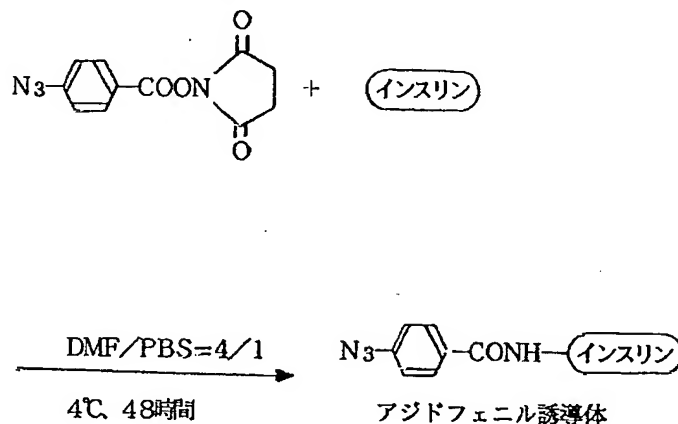
【0026】また、細胞スクリーニング物質12については、ベース11上の領域あるいは2つ以上の領域から形成される領域群により固定化されている細胞スクリーニング物質12の組合せが異なってもよい。これにより細胞スクリーニング物質12の組合せによる細胞の接着性や増殖、分化、生存、未分化状態の維持、細胞死及び物質産出の少なくとも1つの違いを見ることができ

る。【0027】また、細胞スクリーニング物質12については、ベース11上の領域あるいは2つ以上の領域から形成される領域群により、固定化されている細胞スクリーニング物質12の密度が異なってもよい。これにより細胞スクリーニング物質12の密度の変化による細胞の接着性や増殖、分化生存、未分化状態の維持、細胞死あるいは物質産出の違いを、より詳細に見ることができ。そして、液滴吐出手段を用いることの大きな利点の1つは、このように、1つの固定化領域に任意の割合で細胞スクリーニング物質を容易に配置することができることである。

【0028】細胞スクリーニング物質12のベース11上への固定化は、共有結合を介してでも、静電引力を介してでも、生物学的親和性を用いてもよい。共有結合を介してベース11上に固定化する場合は、強固な力で細胞スクリーニング物質12を固定化でき、細胞や培養液などによりその結合力は影響を受けにくく、安定してベース11上に固定化されている。

【0029】ここで、一具体例として、細胞の接着性や増殖、分化、生存、未分化状態の維持、細胞死及び物質

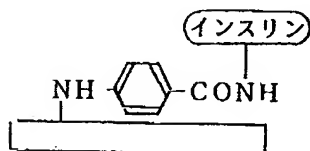
産出の少なくとも1つに影響する物質12として、インスリンを用いる場合の、インスリンをベース11上に共有結合で固定化する方法を図1を用いて説明する。先ず、インスリンにリンカーとしての4-Azidobenzoic acid



【0031】こうして得られたリンカーが結合したインスリン12の溶液を液滴吐出手段13（インクジェットプリンタ）を用いて、例えばポリエチレンテレフタレート（PET）製の基板11上に吐出する。次いで、この基板に対して図1に15として示した光源から光、例えばUV光を照射すると、リンカーのアジド基が開裂してPET製基板の炭素原子とアミド結合を形成し、その結果としてインスリン12が下記式に示すように基板表面に共有結合で固定される。

【0032】

【化2】



ポリエチレンフィルムなどの基板

【0033】また、静電引力による固定化の場合は、化学的な処理を行わなくてもベース11上に固定化でき、化学的な処理による細胞スクリーニング物質12の変性を抑制することができる。さらに生物学的親和性を用いて基板上11に固定化する場合は、細胞スクリーニング物質12の固定化に必要な処理が比較的容易であり、安定した固定化が可能である。

【0034】ベース11は、細胞スクリーニング物質12を安定して固定化できるものであれば材質や形状はいずれでもよい。具体的には、ガラス基板、プラスチックプレート、プラスチックシート、ポリマーフィルム、紙などを好適に用いることができる。さらにベース11は透明であっても、遮光性のものであっても、さらには着色されていてもよい。また、ベース11上に細胞スクリーニング物質12を固定化するため、あるいは、ベース11上での細胞スクリーニング物質12の安定性を高めるため、ベース11上の一部、あるいは全面を化学物質

d N-hydroxysuccinimide ester を導入する（下式参照）：

【0030】

【化1】

により処理したり、放射線を照射する処理をおこなったりしてもよい。

【0035】また、ベース11は、細胞スクリーニング物質12が固定化されている個々の領域、または、2つ以上の領域から形成される領域群が窪んでいてもよい。このことにより、微小液滴吐出手段により配置される液滴の配置を容易にすることができ、更に、窪みにより連結されている個々の領域または領域群ごとに培養液を変えて細胞を培養することができる。このような窪みを有する基板は、樹脂材料の金型成型や、フォトリソグラフィ技術などを用いたエッチング法などにより作製することができる。

【0036】また、ベース11は、細胞スクリーニング物質12が固定化されている個々の領域、または、2つ以上の領域から形成される領域群が壁状構造物により囲まれていてもよい。このことにより、微小液滴吐出手段により配置される液滴の配置を容易にすることができ、更に、窪みにより連結されている個々の領域または領域群ごとに培養液を変えて細胞を培養することができる。このような基板は、フォトリソグラフィ法などを用いることで微細な壁状構造物の作製が可能である。

【0037】このような細胞スクリーニング基板1は以下のようにして作製できる（図1参照）。ベース11はまず、必要に応じて前述した処理を行ってもよい。具体的には、ベース11の洗浄を行い、所望でない物質を取り去ったり、紫外線をはじめとする放射線の照射やコロナ放電を行ったりすることなど様々な化学的物理的処理を行うことができる。また、ポリマー材料やシランカップリング剤などを必要に応じてベース11上の一部あるいは全面に塗布してもよい。

【0038】このようなベース11上に細胞スクリーニング物質12を配置する。配置には、微小液滴吐出手段13を用いる。微小液滴吐出手段13とは、1滴あたりの体積が100 p l以下の液滴が吐出可能なもので、マ

マイクロピペット、マイクロディスペンサーや、インクジェット法を用いた吐出装置が挙げられる。吐出装置が安価に作製でき、微小な液滴が吐出できる点でインクジェット法を用いた吐出装置を好適に用いることができる。さらにインクジェット法の中でも、サーマルインクジェット法とピエゾインクジェット法を好適に用いることができ、サーマルインクジェット法による吐出装置は、吐出口の微細加工が容易で、細胞スクリーニング物質12を高密度に配置することができる。また、ピエゾインクジェット法による吐出装置は、圧電素子の変位により、吐出エネルギーを発生させるので、細胞スクリーニング物質12に熱的なストレスを付加することがなく、細胞スクリーニング物質12を安定して吐出できる。

【0039】また、細胞スクリーニング物質12は、液体化するため適切な溶媒に溶解される。溶剤としては、細胞スクリーニング物質12を安定して溶解させることができるものであればいずれでもよいが、水が好適に用いられる。水としてはイオン交換水(脱イオン水)や細胞スクリーニング物質12を安定して溶解させるため種々の緩衝液を使用するのが好ましい。

【0040】また、必要に応じて水溶性溶剤を用いることができる。水溶性溶剤は水に溶解するものであればいずれでもよく、例えば、メチルアルコール、エチルアルコール、*n*-プロピルアルコール、イソプロピルアルコール、*n*-ブチルアルコール、*sec*-ブチルアルコール、*tert*-ブチルアルコール等の炭素数1~4のアルキルアルコール類；ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド等のアミド類；アセトン、ジアセトンアルコール等のケトンまたはケトアルコール類；テトラヒドロフラン、ジオキサン等のエーテル類；ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール等のポリアルキレングリコール類；エチレングリコール、プロピレングリコール、ブチレングリコール、トリエチレングリコール、1,2,6-ヘキサントリオール、チオジグリコール、ヘキシレングリコール、ジエチレングリコール等のアルキレン基が2から6個の炭素原子を含むアルキレングリコール類；グリセリン；エチレングリコールモノメチルエーテル、エチレングリコールモノエチルエーテル、エチレングリコールモノブチルエーテル、ジエチレングリコールモノメチルエーテル、ジエチレングリコールモノエチルエーテル、ジエチレングリコールモノブチルエーテル、トリエチレングリコールモノメチルエーテル、トリエチレングリコールモノエチルエーテル、トリエチレングリコールモノブチルエーテル等の多価アルコールの低級アルキルエーテル類；*N*-メチル-2-ピロリドン、2-ピロリドン、1,3-ジメチル-2-イミダゾリン等が挙げられる。これらの1種又は2種以上を適宜選択して使用できる。これらの多くの水溶性有機溶剤の中でもジエチレングリコールなどの多価アルコール、トリエチレングリコールモノメチルエーテル等の低級アルキルエーテルが好ましい。

【0041】これらの中でもエタノールあるいはイソプロピルアルコール、又は多価アルコールの低級アルキルエーテル類を添加することによって、サーマルジェットタイプの場合には、インクジェットの吐出口内の薄膜抵抗体上でのインクの発泡をより安定に行うことができるため好適に用いることができる。

【0042】また、本発明にかかる少なくとも細胞スクリーニング物質12を含む液体には、上記成分のほか必要に応じて所望の物性値を持つ溶液とするために、界面活性剤、消泡剤、防腐剤、無機塩類、有機塩類等を添加することができる。

【0043】例えば、界面活性剤としては細胞スクリーニング物質12に対して保存安定性等の悪影響を及ぼさないものであればいずれでも用いることができ、例えば、脂肪酸塩類、高級アルコール硫酸エステル塩類、液体脂肪油硫酸エステル塩類、アルキルアリルスルホン酸塩類等の陰イオン界面活性剤、ポリオキシエチレンアルキルエーテル類、ポリオキシエチレンアルキルエステル類、ポリオキシエチレンソルビタンアルキルエステル類、アセチレンアルコール、アセチレングリコール等の非イオン性界面活性剤があり、これらの1種又は2種以上を適宜選択して使用できる。

【0044】微小液滴手段13によりベース11上の所望の位置に細胞スクリーニング物質12を配置した後、細胞スクリーニング物質12をベース11上に固定化する。ベース11上に細胞スクリーニング物質12を固定化するために、細胞スクリーニング物質12に予め固定化に必要な処理を行ってもよいし、基板上に予め固定化に必要な処理を行ってもよい。細胞スクリーニング物質12への処理としては、共有結合に必要なアミノ基、カルボキシル基、ジスルフィド基、エポキシ基、カルボジイミド基、マレイミド基などの官能基を細胞スクリーニング物質12へ導入してもよく、静電引力を介して結合させるのに必要な金属および無機酸化物微粒子やカチオン性高分子やアニオン性高分子など帯電可能な物質を結合させてもよい。また、生物学的親和性を用いて結合させるために、アビジン分子やビオチン分子を結合させてもよく、抗原分子や抗体分子など生物学的親和力により結合しうる物質を結合させてもよい。また、基板表面に、高分子やシランカップリング剤をコーティングし、共有結合に必要なアミノ基、カルボキシル基、ジスルフィド基、エポキシ基、カルボジイミド基、マレイミド基などの官能基を導入してもよいし、基板表面を帯電させるため、金、銀、白金、鉄などの金属やインジウム錫酸化物、酸化チタン、酸化亜鉛などの無機酸化物さらにはポリアセチレン、ポリピロール、ポリアニリン、ポリチオフェンなどの導電性高分子など、導電体層や半導体層を予め基板表面に形成してもよい。更には細胞スクリーニング物質12に導入した生物学的親和性を有する物質と結合力を有するビオチン分子やアビジン分子、抗体分

子や抗原分子、抗体結合能を有するプロテインAなどの蛋白質をベース11表面に設けてもよい。これら物質を導入することにより、ベース11表面と細胞スクリーニング物質12の結合力を強固なものにすることができる。

【0045】固定化の際には、光をはじめとする放射線照射や、加熱などによりエネルギーを外部から加えてもよい。これらエネルギーを外部から加えることでベース11表面と細胞スクリーニング物質12の結合を促進することができる。

【0046】以上のようにして細胞スクリーニング基板1が作製できる。

【0047】次に前述した細胞スクリーニング基板1上で細胞を培養する方法について述べる。このような基板上で細胞を培養することにより、細胞が接着性や増殖・分化、生存、未分化状態の維持、細胞死または物質産出に対し影響を受けながら培養されることとなる。細胞は特に制限されるものはなく、いずれの細胞でも用いることができる。また、一度にスクリーニングする細胞は1種類でもまた2種類以上であってもよい。細胞を培養する前に必要に応じて細胞スクリーニング基板1上に紫外線などを照射したり、アルコール溶液で洗浄することにより殺菌処理してもよい。これにより所望でない微生物などにより培養が阻害されないようにすることができる。なお、細胞スクリーニング基板1全体を培養液に浸漬して細胞培養を行ってもよいが、少なくとも細胞スクリーニング物質が固定化されている領域が培養液に浸漬されていれば、細胞の接着性や増殖・分化、生存、未分化状態の維持、細胞死さらには物質産出に影響を与えながら培養することが可能である。

【0048】また、細胞スクリーニング基板1上で細胞を培養している際、あるいは一定期間の細胞培養後、所望の領域の培養液中に所望の物質を添加してもよい。これにより細胞の増殖・分化、生存、未分化状態の維持、細胞死あるいは物質産生を変化させたり、基板上への接着性を変化させたりすることができる。または、細胞培養後のスクリーニングの際に指示薬など所望の物質を所望の領域に添加してもよい。これにより、スクリーニングを容易に行うことが可能となる。

【0049】また、細胞スクリーニング基板1上で細胞を培養している際、あるいは一定期間の細胞培養後、培養細胞群を基板上から取り外してもよい。こうすることで培養細胞が取り除かれた基板を再度利用することができる。また、取り外した培養細胞群を人工的に作製した生体組織あるいはその一部として利用することもできる。具体的な方法としては、培養後のスクリーニング基板をトリプシン処理することにより、培養された細胞群を取り除くことができる。これにより再度基板を利用することができる。この基板の再利用は、細胞スクリーニング物質を基板に固定したことで、細胞が当該スクリーニ

ング物質を代謝系に取り込めなくしたことによって得られる効果の一つである。また、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)のような温度により水溶性が変化するポリマーを予め基板上に塗布し、その上で細胞培養すると、温度を約30℃以下にすれば、培養された細胞群はポリマー表面の水の状態の変化により基板から取り外すことができる。これにより細胞群を生体組織などに利用することができる。

【0050】次に前述した細胞スクリーニング基板1上で細胞を培養し、細胞および基板上に固定化された物質のスクリーニング法について述べる。スクリーニング手段としては前述した細胞スクリーニング基板1上で培養された細胞の形態変化を観察する方法を用いることができる。顕微鏡は、光学顕微鏡はもちろんのこと、走査型電子顕微鏡、透過型電子顕微鏡や走査型プローブ顕微鏡、蛍光顕微鏡など、細胞の形態が観察可能なものであればいずれでもよい。細胞が培養された細胞スクリーニング基板を前記顕微鏡の観察位置に配置し、顕微鏡観察により細胞の形態を観察する。顕微鏡により細胞形態を観察することのみでスクリーニングが可能であり、簡易な方法で評価を行うことができる。また、評価の際には細胞を染色してもよい。細胞染色を行うことにより、細胞が高密度に増殖した場合や、分化により細胞同士が融合し、多核細胞となった場合などは顕微鏡での観察による評価を容易に行うことができる。

【0051】また、形態観察以外にも細胞が基板上に接着し、または増殖や分化をする過程やその結果、細胞で産出された物質や細胞内に取り込まれた物質を定量し、スクリーニング手段として用いてもよい。ここで、定量対象が直接評価できない場合は、その代替となる物質を定量してもよく、具体的には遺伝子工学の手法を用いて、所望の定量対象となる蛋白質の遺伝子付近に定量可能な蛋白質の遺伝子を組み入れ、その定量可能な蛋白質を定量することで所望の蛋白質を定量してもよい。これら物質を評価することで、基板上に固定化された物質により細胞内でどのような変化が起きているかを詳細に調べることができ、細胞内での情報伝達機構の解明にもつながる。細胞内に取り込まれた物質で評価を行う場合は、予め取り込まれるであろう物質に評価可能な指標を設けておくことも可能で比較的容易に定量が可能である。

【0052】これら物質の定量には、放射性化合物より放出される放射線量を測定する方法や、蛍光物質で標識された物質から発せられる蛍光量を測定する方法、更には、発光物質から発せられる発光量を測定する方法や色素の吸光度を測定する方法がある。

【0053】放射性化合物より放出される放射線量を測定する方法では、水素、炭素、窒素、リン、硫黄などの生体内に多く含まれる元素の放射性同位元素により置換された化合物を用いて、それら化合物から放出される放

射線量を測定する方法が非常に感度がよく、しかも、これら物質は化学的な性質は通常の化合物と変わらないので、細胞の代謝活動に影響を与えず、生体内と同様の現象が観察可能である。

【0054】また、蛍光物質による標識は比較的容易で、低分子化合物でもあるので細胞の代謝活動に与える影響が少ない。また、抗原抗体反応を用いた定量法によって細胞で産出された物質などを定量する場合、蛍光物質で標識された抗体は種々市販されており、測定感度も高いので、蛍光測定による評価は有効である。

【0055】さらに発光物質から発せられる発光量を測定する方法では、発光量は高感度に測定が可能のため、ごくわずかな変化も捕らえることが可能である。スクリーニング物質による接着や増殖、分化、あるいは物質産出に伴って発現される遺伝子が特定されている場合には、その遺伝子付近にホタルルシフェラーゼ遺伝子などを導入しておき、遺伝子発現とともに産出されるホタルルシフェラーゼ量をATPとルシフェリンの添加で生じる発光量により測定する。このことにより、スクリーニング物質による影響を発光量で評価することが可能である。

【0056】色素の吸光度を測定する方法では、酵素反応などを併用することにより色素による吸光度の増幅が可能で、微量の物質の定量も可能となる。

【0057】また、前述した細胞スクリーニング基板上で細胞を培養し、細胞及び基板上に固定化された物質のスクリーニングを行うための装置について述べる。微小液滴吐出手段によって2種類以上の細胞スクリーニング物質を基板上の所望の領域に配置して固定化し、且つ、異なる細胞スクリーニング機能を有する複数の領域を有する細胞スクリーニング基板の細胞スクリーニング物質の固定領域に接触する培養液中で細胞を培養する手段を有することが特徴であるが、更に、前記細胞スクリーニング基板を製造する手段、あるいは、前記培養手段による細胞の形態変化の評価手段、細胞内で合成された物質の定量手段および細胞内に取り込まれた物質の定量手段の少なくとも一手段を有していてもよい。本願発明にかかる装置の一例を図6に示す。該装置の基板投入室(601)より基板(600)を投入し、スクリーニング物質付与室(602)にて、微小液滴吐出手段を用いて基板上にスクリーニング物質を付与した後、固定化室(603)で、前記スクリーニング物質を光や熱照射等によって固定化し細胞スクリーニング基板が製造される。次に、培養室(604)に基板が運ばれ、前記した方法で該基板上の細胞を培養した後、検出室(605)で、細胞の形態変化、細胞の接着性、増殖・分化、生存、未分化状態の維持、細胞死さらには物質産出を観察あるいは前記した定量手段によって細胞のスクリーニングを行う。

【0058】ここで、601～603は例えば、図7に

示されるような装置であっても良い。図7中、710は微小液滴吐出装置である。基板600はストッカー711にセットされており、搬送機712によりベルトコンベアー713に送られ、トレー715に送り出される。714は、送りのための補助ローラである。トレー715に送られた基板600は、ポンプ716での吸引によりトレー上にしっかりと吸着固定される。トレー715上の基板600が第1の処理工程が行われる領域に送り込まれる。704はUV/O₃ランプであり、基板の前処理を行う。717の送りモータで第1の工程の領域から基板が搬出されると、微小液滴吐出手段710によって、細胞スクリーニング物質が付与される。スクリーニング物質が付与された基板は、第3の工程の固化処理が行われる領域に直ちに搬送され該物質は基板上に固定化される。ここで、705はUV照射ランプである。以上の3つの処理工程を経た基板は、ベルトコンベアー720と送りローラ721を介して次の604の工程に搬送される。

【0059】しかしながら、本願発明にかかる細胞スクリーニング装置は、これら以外の態様であっても、前記目的が達成されるものであれば特に限られるものではない。

【0060】

【実施例】以下に実施例を挙げて、本発明をより詳細に説明するが、これらの実施例は、本発明のより一層の深い理解のために示される具体例であって、本発明は、これらの具体例に何ら限定されるものではない。

実施例1

(細胞の増殖因子を評価する細胞スクリーニング法) 細胞スクリーニング物質は基板上に固定化するため、以下の方法により、官能基を導入した。50mmolのジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)のテトラヒドロフラン(THF)溶液をN-ヒドロキシスクシンイミド50mmolと4-アジドベンゼンカルボン酸45mmolのTHF溶液に滴下し、4℃で24時間攪拌しながら反応させた。反応生成物を減圧乾燥後、イソプロパノール/ジイソプロパノール溶液中で再結晶化し精製した。続いてこの反応生成物をジメチルホルムアミドで溶解し、リン酸等張緩衝液(pH7.0)中に溶解して細胞スクリーニング物質を少量ずつ滴下していった。4℃で、48時間攪拌し、細胞スクリーニング物質にアジド基を導入した。

【0061】ここで、細胞スクリーニング物質としてはインスリン、塩基性繊維芽細胞成長因子(basic-FGF)、上皮細胞成長因子(EGF)、トランスフォーミング成長因子β(TGF-β)を用い、それぞれにアジド基を導入した。インクカートリッジを精製水で洗浄した後、官能基が導入された各細胞スクリーニング物質を含むリン酸等張緩衝液(pH7.0)を50%メタノール溶液で希釈し、50μg/mlの濃度としたものを充填した。

【0062】続いて、図1に示すように、ポリエチレン

テレフタレート (PET) フィルムのベース 11 上に、各細胞スクリーニング物質 12 をインクジェットプリンターで吐出した。それぞれの細胞スクリーニング物質 12 が互いに重なり合わないよう、図 2 で示すように、インスリン固定化領域 121、塩基性繊維芽細胞成長因子固定化領域 122、上皮細胞成長因子固定化領域 123、トランスフォーミング成長因子固定化領域 124 にそれぞれ吐出した。液滴が乾燥後、紫外線ランプを用いて、ベース 11 表面に紫外線を照射し、細胞スクリーニング物質 12 を固定化した。未反応の細胞スクリーニング物質 12 を取り去るため、リン酸等張緩衝液 (pH=7.0) により、ベース 11 上を洗浄した。このようにして細胞スクリーニング基板 1 を作製した。

【0063】この細胞スクリーニング基板 1 上で細胞のスクリーニングを行った。

【0064】予め殺菌灯で殺菌したスクリーニング基板をガラスシャーレに入れ、10 μ g/ml Transferrin を添加した DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's minimum essential medium) 培地を培養液として用いた。スクリーニング基板上で血管内皮細胞を培養し、5%CO₂ を含む湿潤空気中で 37°C、24 時間培養した。また、培養液には、³H-チミジンを加え、増殖の程度を評価するため、培養後の増殖により細胞中に取り込まれた ³H-チミジンの量を ³H の放射線量により測定した。

【0065】培養後の基板を顕微鏡観察すると、インスリン、basic-FGF、EGF 固定化領域では、細胞が増殖している様子が観察された。しかし、TGF- β 固定化領域では、細胞の増殖は観察されなかった。

【0066】また、³H の放射線量により細胞の増殖密度を求めると、インスリン固定化領域が、10000 個/mm²、basic-FGF 固定化領域では、6000 個/mm²、EGF 固定化領域では、8000 個/mm² であった。また、TGF- β 固定化領域では、100 個/mm² であった。以上の結果から、インスリン、basic-FGF、EGF には血管上皮細胞の増殖効果があり、TGF- β には増殖効果がないことがわかった。

【0067】実施例 2

(細胞の増殖・分化因子を評価する細胞スクリーニング法) 上記固定化官能基導入法により、インスリン様成長因子-1 (IGF-1)、basic FGF122、EGF、TGF- β にアジド基を導入した。実施例 1 と同様にインクジェットプリンターを用いて、PET フィルム上に各細胞スクリーニング物質を吐出し、基板上に固定化した。この時、配置パターンは図 3 のとおりである。図 3 のように、基板上には、4 つの細胞スクリーニング物質がそれぞれ単独で固定化された、単独固定化領域 12a と、2 つの細胞スクリーニング物質が近接して固定化された、2 物質固定化領域 12b がある。なお、この様に、同一基板上で、2 種以上の細胞スクリーニング物質が固定化された位置の関係を变化させた複数の領域を容易に形成できることは、細胞スクリーニング物質の基板への付与に、液滴吐

出手段を用いることの大きな利点の 1 つである。

【0068】この基板上で、ニフトリ骨格筋細胞を培養した。10 μ g/ml フィブロネクチンを添加した DMEM 培地を培養液として用い、実施例 1 と同様の条件で培養を行った。増殖、及び分化の状況を Amersham Cell proliferation kit を用いて評価した。これは、5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) のフルオレセインイソチオシアネート (FITC) 標識抗体を用いて、DNA 合成量を蛍光抗体法で評価するものである。また、培養後の細胞を染色して増殖密度の評価を行った。その手順は、培養後の細胞をメタノールで 30 分処理、乾燥後、Hoechst 33258 を 1 万倍に希釈し、5 分反応させ、核を染色した。余分な染色液をリン酸等張緩衝液で洗った。この基板をスライドガラス上に置き、グリセリンを滴下した後、カバーガラスを被せた。このようにして調製した基板を蛍光顕微鏡で観察、染色されている核の数を評価した。また、蛍光定量法により BrdU で標識された DNA を含む核の数を定量した。その結果、IGF-1、EGF では、蛍光量が増加し、細胞の核が密集している様子が観察された。このことから細胞の増殖、分化が促進されていることがわかる。また、basic FGF では、蛍光量は増加されたが、細胞核は分散していた。このことから、増殖は活性化されたが、分化は促進されなかった。TGF- β については、蛍光量の増加はそれほど観察されなかった。よって、増殖が促進されなかったと考えられる。また、2 つの細胞スクリーニング物質が組み合わされた領域では、互いに増殖、分化に対し活性があった IGF-1 と EGF が組み合わされた領域で、蛍光量の増加が見られず、増殖が抑制されていた。このように単独では、活性がある細胞スクリーニング物質も組み合わせられると抑制効果を発現することがわかった。

【0069】実施例 3

(アレルゲンスクリーニング法) 本実施例では、アレルゲンとなりうる物質を基板上に固定化し、その基板上で人から採取した細胞を培養したときに細胞から産出される炎症惹起物質であるヒスタミンを定量することで、その人がアレルギー体質を有するかどうかを評価するものである。

【0070】本実施例では図 4 に示すようなスギ花粉、牛乳、ハウスダスト、小麦に対するアレルギー体質であるかどうかを評価する基板を作製した。各アレルゲンが単独で固定化された領域 12a と複数のアレルゲンの相乗効果によりアレルギーを発症するかを診断できるようにするため、各アレルゲンが近接して固定化されている、2 物質固定化領域 12b、3 物質固定化領域 12c、4 物質固定化領域 12d を設けた。

【0071】スギ花粉、ハウスダスト、小麦については、予めホモジナイザーを用いて十分にすりつぶしておいた。そして、各アレルゲンを含む水溶液を遠心分離した後、沈降分を除く溶解成分を固定化することとした。続いて各アレルゲン溶液を 50% メタノール溶液で希釈

し、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度として、実施例1記載の方法で、PETフィルム上にインクジェットプリンターを用いて固定化した。固定化パターンは図4に従った。また、固定化されていない領域はウシ血清アルブミンにより非特異吸着が起こらないように被覆した。

【0072】細胞は、評価対象の人から血液を採取し、密度勾配遠心分離法により、血液成分を分離し、アレルギー反応性細胞を取り出した。

【0073】培養液を10%ウシ胎児血清 (FBS) を含むDMEM培地とし、抗ヒスタミン抗体 (ウサギ) を添加して基板上で細胞を培養した。

【0074】培養後の基板を取り出し、リン酸等張緩衝液で洗浄した。メタノールで30分処理、乾燥後、ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識抗ウサギIg抗体を用いて、酵素抗体法により α -フェニレンジアミンの吸光度変化からヒスタミン量を定量した。その結果、ハウスダストから抽出された物質を固定化した領域からヒスタミンが多量に検出されたことから、この人はハウスダストに対しアレルギー体質であると考えられる。また、スギ花粉、牛乳、小麦に対しては、陰性と考えられるが、牛乳、小麦が近接して固定化された領域では、ヒスタミンが多量に検出されたので、2つを同時に摂取するとアレルギーを発症する可能性があることがわかった。

【0075】このように、本基板を用いることで、何に対するアレルギーがあるかを診断することが可能である。特に、本実施例のように、複数のアレルギーに対す

るアレルギー反応を診断することができる。

実施例4

(固定化物質の密度による増殖・分化スクリーニング基板) 繊維芽細胞であるNRK細胞がEGFとTGF- β により細胞増殖に受ける影響を調べることとした。実施例1に基づき、2つの細胞成長因子EGFとTGF- β にはそれぞれ予めアジド基を導入しておいた。基板は、PETフィルムを用い、インクジェットプリンターを用いて各細胞成長因子を基板の位置により、密度が異なる組み合わせとなるよう図5に従って基板上に吐出し、乾燥後、紫外線を照射し固定化した。なお、吐出量はプリンタを接続したコンピュータから送信した描画データのドット密度を各領域において設定することにより制御した。図5中の数字は、各成長因子の行方向あるいは列方向の相対的なドット密度で、2つの数字が交差する領域は、この数字により設定されたドット密度で各成長因子が固定化されていることを示している。

【0076】このようにして作製した基板上でNRK細胞を培養した。培養液はBrdUを添加し、0.5wt% FBSを含むDMEM培地中を用い、5%CO₂濃度の湿潤空気下で、37℃で48時間培養した。

【0077】培養後は、Amersham Cell proliferation kitを用いて評価した。評価結果は表1に示す通りである。

【0078】

【表1】

表1

細胞密度		TGF- β 密度			
10 ⁵ 個/mm ²		0	4	20	100
EGF密度	0	14	42	34	30
	4	40	14	13	14
	20	60	12	12	10
	100	80	20	20	20

【0079】NRK細胞はEGF、TGF- β の単独の作用により増殖の促進を受けると考えられるが、両者の組み合わせにより、増殖阻害効果が発現するものと考えられる。このようにしてNRK細胞に対するEGF、TGF- β の細胞増殖に与える効果から、EGF、TGF- β が共存しない培養液において培養することがよいことがわかった。

【0080】

【発明の効果】本発明の細胞スクリーニング基板は、細胞スクリーニング物質を簡易な工程で確実に所望の位置に固定化でき、細胞の接着性や増殖、分化、生存、未分化状態の維持、細胞死及び物質産出の少なくとも1つに影響する物質をスクリーニングすることができる。

【0081】本発明の細胞スクリーニング法により、1枚の基板上で様々な物質による細胞への影響を調べることが可能で、また、様々な物質が種々の細胞に与える影響の違いを調べることが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1の細胞スクリーニング基板の製造方法の一例である。

【図2】実施例1の細胞スクリーニング基板における細胞スクリーニング物質の配列法の一例である。

【図3】実施例2の細胞スクリーニング基板における細胞スクリーニング物質の配列法の一例である。

【図4】実施例3のアレルゲンスクリーニング基板におけるアレルゲンの配列法の一例である。

【図5】実施例4のスクリーニング基板における細胞スクリーニング物質の配列法の一例である。

【図6】本願発明にかかる細胞スクリーニング装置の一例である。

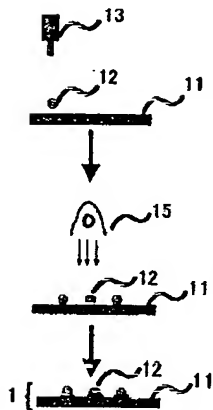
【図7】本願発明にかかる細胞スクリーニング装置の細胞スクリーニング基板製造手段の一例である。

【符号の説明】

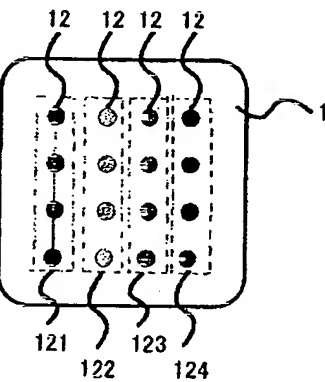
- 1 細胞スクリーニング基板
 11 ベース基板
 12 細胞スクリーニング物質
 12a 単独固定化領域
 12b 物質固定化領域
 12c 物質固定化領域
 12d 物質固定化領域

- 13 微小液滴吐出手段
 15 紫外線照射ランプ
 121 インスリン固定化領域
 122 塩基性繊維芽細胞成長因子固定化領域
 123 上皮細胞成長因子固定化領域
 124 トランスフォーミング成長因子 β 固定化領域

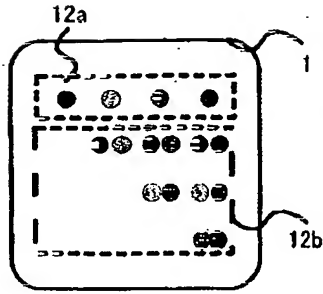
【図1】



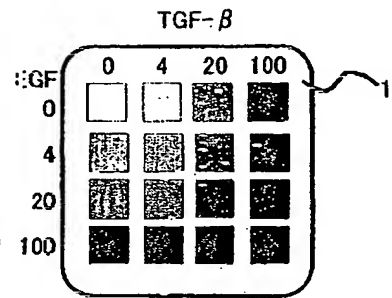
【図2】



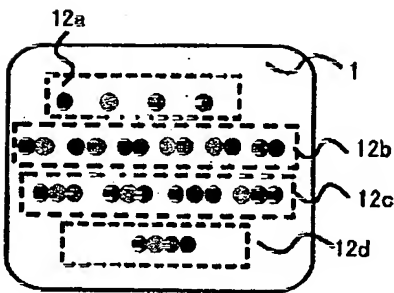
【図3】



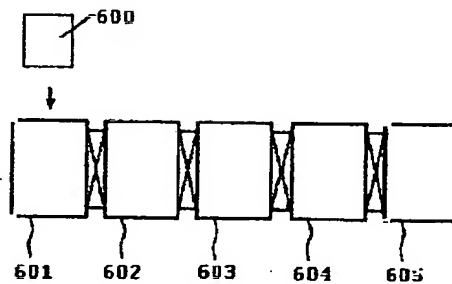
【図5】



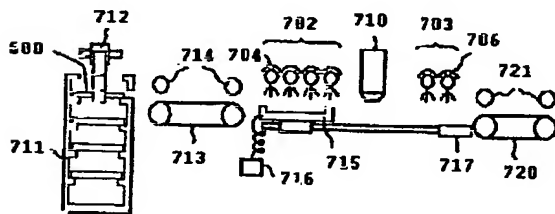
【図4】



【図6】



【図7】



フロントページの続き

(72)発明者 渡辺 耕平

東京都調布市深大寺元町4-14-3

Fターム(参考) 2G045 BB20 BB48 CB01 DA13 FB03
FB08 FB12 GC10 GC15
2G054 AA08 AB04 CE02 EA03 EA04
GA02
4B029 AA07 BB11 CC01 FA04 FA09
4B063 QA01 QA05 QA18 QA19 QQ08
QR48 QR66 QR77 QR82 QX02
QX07

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.